Studien zur Entwicklung der Sterigmenproliferation bei Aspergillus amstelodami (Mangin) Thom and Church

1. Studien zur Morphologie und Physiologie der Sterigmenproliferation bei Aspergillus amstelodami (Mangin) Thom and Church
2. Eine Sektorenvariante mit proliferierten Sterigmen von Aspergillus amstelodami (Mangin) Thom and Church

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ilse Bleul

aus Jena

1962

1. Referent: Prof. Dr. H. Braun
2. " : Fr. Prof. Ch. Nielke

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Dezember 1961

Tag der Promotion: 25. Juli 1962

Archiv für Mikrobiologie 44, 23—46 (1962)

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin

Studien zur Morphologie und Physiologie der Sterigmenproliferation bei Aspergillus amstelodami (Mangin) Thom and Church*

Von
Ilse Bleul

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. April 1962)

Die morphologischen Merkmale der Conidien und Sterigmen werden zur Charakterisierung der Gattungen und Arten bei den meisten *Aspergillaceen* verwendet. Abweichungen von der typischen Wuchsform, die über die normale Variationsbreite hinausgehen, müssen daher besonders auffallen. So ist die Neigung einiger *Aspergillus*-Arten zum Auswachsen der Sterigmen von verschiedenen Autoren beobachtet worden. Barnes (1928) erwähnt die häufigen Proliferationen von Conidienträgern bei einem Stamm von *Aspergillus amstelodami* (nach Thom u. Raper 1945, S. 144). Auch Sabet (1936) war das Auftreten von „proliferating conidiophores . . . in cultures of *Aspergillus* grown under very humid conditions" bekannt. Die Mutanten, deren Entstehung Schiemann (1912) bei *Asp. niger* durch Hitze und Chemikalien auslösen konnte, wichen nicht nur in ihren physiologischen Eigenschaften, sondern auch morphologisch in der Ausbildung ihrer Sterigmen vom Ursprungsstamm ab. Die gleichen Morphosen traten aber auch modifikativ auf Nährböden auf, die 0,1% $CuSO_4$ enthielten. Yuill u. Yuill (1938) beschreiben eine Mutante — wiederum von *Asp. niger* abstammend —, bei der die Sterigmen stets zu sterilen Zellen oder Zellreihen umgebildet wurden und keine Conidien mehr abgliederten. Diese Form war konstant; das gilt auch für eine Art mit nicht ganz so ausgeprägten Morphosen, die Smith (1943) als *Asp. proliferans* beschreibt.

Im Gegensatz zu den mutativ entstandenen Formen sind die modifikativ aufgetretenen Abweichungen von der normalen Sterigmenbildung nicht ausführlicher untersucht worden. Nach den mehr gelegentlichen Beobachtungen älterer Autoren hat es Thielke (1958) unternommen, die Bedingungen für die Entstehung proliferierter Sterigmen

* Gekürzte Fassung einer Dissertation der Math.-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität Berlin 1961.

an *Asp. repens* experimentell zu prüfen. Die emersen Sterigmenproliferationen von *Asp. repens* ließen sich eindeutig durch die Wasserdampfspannung und durch die Konzentration des Nährbodens beeinflussen. THIELKE weist darauf hin, daß sich an den submersen Proliferationen von *Asp. amstelodami* die Faktoren für die Störung der Sterigmenmorphogenese möglicherweise noch besser prüfen lassen. Es sollte daher die Aufgabe der vorliegenden Arbeit sein, festzustellen, wodurch die submersen Sterigmenproliferationen begünstigt werden und warum bei *Asp. amstelodami* niemals Proliferationen am Luftmycel, sondern nur im Nährboden zu beobachten sind.

Material und Methode

Zu den Untersuchungen dienten drei Stämme von *Asp. amstelodami*, „*A 57*" und „*A 58*" aus dem Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland. Den Stamm „*A 45*" verdanken wir Herrn Dr. U. TAUBENECK, Jena, der ihn aus einer Laborinfektion isolierte. Die drei Stämme verhielten sich grundsätzlich ähnlich. Da sich Stamm „*A 45*" durch größere Widerstandsfähigkeit bei Temperaturveränderungen und etwas kräftigeres Wachstum auszeichnete, wurde er bevorzugt verwendet.

Die Nährböden hatten folgende Zusammensetzung: 1. „Peritheciennährlösung" nach SCHÖNBORN (1955) + 1,5% Agar, 2. „Conidiennährlösung" nach SCHÖNBORN + 1,5% Agar, 3. Czapek-Dox-Agar (THOM u. RAPER 1945), 4. Malz-Agar: 3—30% Trockenmalzextrakt („Maltzin", Diamalt A.G., München), 1,5% Agar, Leitungswasser. Der Agar wurde nach den Angaben von JANKE (1946) gewässert, für die Mangelkulturen ausgefault. Puffersubstanzen (nach SÖRENSEN 1931 und STRUGGER 1949) wurden den Nährböden vor der Sterilisation zugesetzt. Die Messung des pH-Wertes erfolgte mit der Glaselektrode bei einer Temperatur von etwa 40° C nach der Sterilisation. Als Netzmittel verwendete ich Tween 80 (Fa. Schuchardt, München).

Die Agarnährböden wurden in 10 cm-Petrischalen ausgegossen. Jede Petrischale enthielt 20 cm³ Nährböden. Für die flüssigen Nährböden verwendete ich 100 ml-Kölbchen mit je 50 cm³ Nährlösung. Nach der Sterilisation im Autoclaven bei 1,0 atü beimpfte ich die Nährböden mit Sporen von etwa 7 Tage alten Stammkulturen. Die Kolonien wurden im Brutschrank bei 28° C kultiviert. Die relative Feuchte des die Petrischalen umgebenden Raumes betrug stets etwa 95%. Als Meßinstrument diente ein Haarhygrometer. Die Serien wurden so angesetzt, daß jeden 2. Tag je fünf Kulturen der gleichen Serie zur Untersuchung kommen konnten. Da die mikroskopische Kontrolle der Kulturen bei geöffnetem Schalendeckel erfolgte, fielen stets einige Platten durch Verunreinigung aus. Das auf flüssigen Nährlösungen gewachsene Mycel brachte ich zur Untersuchung auf einen Objektträger.

Anordnung der Sauerstoffmangel-Versuche siehe S. 37.

Zur Darstellung der Zellkerne dienten die Feulgensche Nuclealreaktion (Hitzefixierung, 4 min Hydrolyse in n-HCl bei 60° C), die Giemsa-Färbung nach HRUSHOVETZ (1956) (Fixierung in Carnoyschem Gemisch: Alk.: Eisessig = 3:1) und die Färbung mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN (Fixierung in Carnoy). Die lebenden Kerne wurden nach der Agarfilm-Methode (GIRBARDT 1956) im Phasenkontrastmikroskop beobachtet.

Morphologische Untersuchungen

Asp. amstelodami kann sowohl Perithecien als auch Conidien bilden. SCHÖNBORN (1955) untersuchte die Beeinflußbarkeit der Fortpflanzungsart

bei dieser Art genauer. Seine Erfahrungen — vor allem in bezug auf die Vermehrung der Conidienbildung auf alkalischem sowie auf Pepton enthaltendem Nährboden — treffen auch auf die drei in dieser Arbeit verwendeten Stämme zu. Das Temperaturoptimum liegt für unsere Stämme bei 28°C. Die Stammkulturen werden auf einem Agarnährboden mit 5% Maltzin und Leitungswasser bei Zimmertemperatur gehalten. Besonders gutes Wachstum zeigen die Stämme auf 20—30%igem Maltzinnährboden. Das Wachstum kommt hier nach etwa 14 Tagen bei einem Koloniedurchmesser von etwa 8 cm zum Stillstand. Auf Czapek-Dox-Agar wird eine entsprechende Ausdehnung der Kolonien erst nach etwa 3 Wochen erreicht.

Auf festem Nährboden ist die überwiegende Menge des vegetativen Mycels in das Substrat eingesenkt (Submersmycel). Meist liegt nur eine dünne Schicht von Lufthyphen auf der Oberfläche des Nährbodens. Perithecien und Conidienträger entstehen bevorzugt an diesen Lufthyphen. Auch bei flüssigen Nährlösungen lassen sich Submersmycel, das direkt unter der Flüssigkeitsoberfläche schwimmt, und Lufthyphen unterscheiden. Häufig jedoch befinden sich noch Flocken vegetativen Mycels ohne Verbindung zum fruktifizierenden Mycel in der Nährlösung. Sie sinken meist auf den Boden des Kölbchens und sollen daher im folgenden als Bodenmycel bezeichnet werden.

Ein normaler Conidienträger entwickelt sich in vier aufeinander folgenden Phasen: 1. Aus einer Fußzelle erhebt sich der Conidienträgerstiel in einer Länge von 300 μ und einer Breite von etwa 10 μ. 2. Apikal entsteht die Endblase als Auftreibung im Durchmesser von etwa 20 μ. 3. Die Endblase stülpt an ihrer Oberfläche die Sterigmen in einer Länge von etwa 5 μ und der Breite einer normalen Hyphe (3,5 μ) aus. 4. Die Sterigmen schnüren sukzessive Conidien von etwa 5 μ Durchmesser ab. Auf den Standardnährböden Czapek-Dox und 5% Maltzinagar wurden niemals Abweichungen von diesem Entwicklungsablauf bei den Conidienträgern des Luftmycels beobachtet. Innerhalb des Substrats waren jedoch zusätzlich Conidienträger mit proliferierten Sterigmen stets zu finden. Die drei ersten Entwicklungsstadien des normalen Conidienträgers finden sich in teilweise veränderter Form an den Sterigmenproliferationen im Substrat wieder. So kann man zahlreiche Conidienträgerstiele im Substrat beobachten, kurz bevor Conidienträger mit proliferierten Sterigmen auftreten. Unter bestimmten Verhältnissen bilden aber auch derartige Entwicklungsstadien bereits proliferierende Sterigmen, ohne zur Anlage einer Endblase gekommen zu sein (Abb. 1). In alternden Kulturen treten Conidienträger mit kurzen Sterigmen in großer Anzahl im Nährboden auf und bleiben dann stecken. Von dieser Wuchsform gehen aber auch die typischen Sterigmenproliferationen aus, wie sie in großer Anzahl unter der Nährbodenoberfläche am Rande der

Kolonien zu erkennen sind (Abb. 2, 3a und 3b). Conidienträgerstiel und Endblase sind dabei in Größe und Form ebenso ausgebildet wie bei einem normalen Conidienträger. Die Zahl der angelegten Sterigmen ist im allgemeinen etwas niedriger als bei der normalen Form. Ebenso wie bei den von THIELKE (1957, 1958) beschriebenen Morphosen von *Asp. repens* werden die Sterigmenanlagen zu langen Schläuchen. Viele dieser Hyphen behalten die Breite einer Sterigme und wachsen unverzweigt oder mit

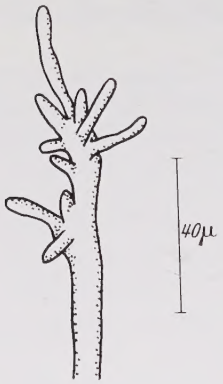


Abb. 1
Aspergillus amstelodami. Conidienträger mit proliferierten Sterigmen ohne Ausbildung einer Endblase im Nährboden (nach Frischpräparat)

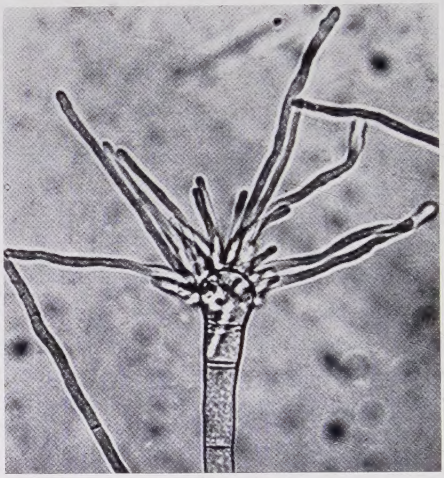


Abb. 2
Aspergillus amstelodami. Conidienträger mit stark verlängerten Sterigmen im Substrat (Frischpräparat)

kleinen Seitenhyphen zu Hyphen von 200 μ Länge und mehr aus (Abb. 3a). In anderen Fällen schwellen die Proliferationen zur Breite eines Conidienträgerstieles an und entwickeln erneut Endblasen mit Proliferationen. Neben solchen Sekundärköpfchen treten oft Ascogone im Nährboden auf (Abb. 3b), die jedoch auch die Tendenz zeigen, als vegetative Hyphen weiterzuwachsen und niemals Perithecien hervorbringen. Die Phase der Conidienbildung wird bei den submersen Proliferationen des *Asp. amstelodami* niemals erreicht. Dagegen lassen sich recht oft Conidien tragende Köpfchen über dem Nährboden erkennen, deren Fußzelle aus einer proliferierten Sterigme entstanden ist. Sogar Sekundärköpfchen submerser Proliferationen erheben sich bisweilen über die Agaroberfläche und bilden dort normale Conidien.

In der Gattung *Aspergillus* sind die Zellen des vegetativen Mycels mehrkernig. Auch die Fußzellen der Conidienträger, die Conidienträgerstiele und die Endblasen besitzen in der Regel eine größere Anzahl Kerne. Einkernige Conidien sind bei *Asp. flavus*, *Asp. fumigatus*, *Asp. niger* und *Asp. clavatus* gefunden worden (DANGEARD 1907; BAKER 1945). Sie

entstehen bei *Asp. niger* und *Asp. clavatus* an einkernigen Sterigmen. Der Kern bleibt bis zur Keimung der Conidie in Ruhe. Im Gegensatz dazu werden bei *Asp. echinulatus* mehrere Kerne von der Endblase an die Sterigmen abgegeben, die ihrerseits mehrkernige Conidien bilden (Baker 1945). Nach Yuill (1950) sollen innerhalb der *Aspergillus glaucus*-Gruppe unter anderem *Asp. amstelodami* und *Asp. chevalieri* ausschließlich einkernige Conidien besitzen. Dieser Befund ließ sich auch bei unseren

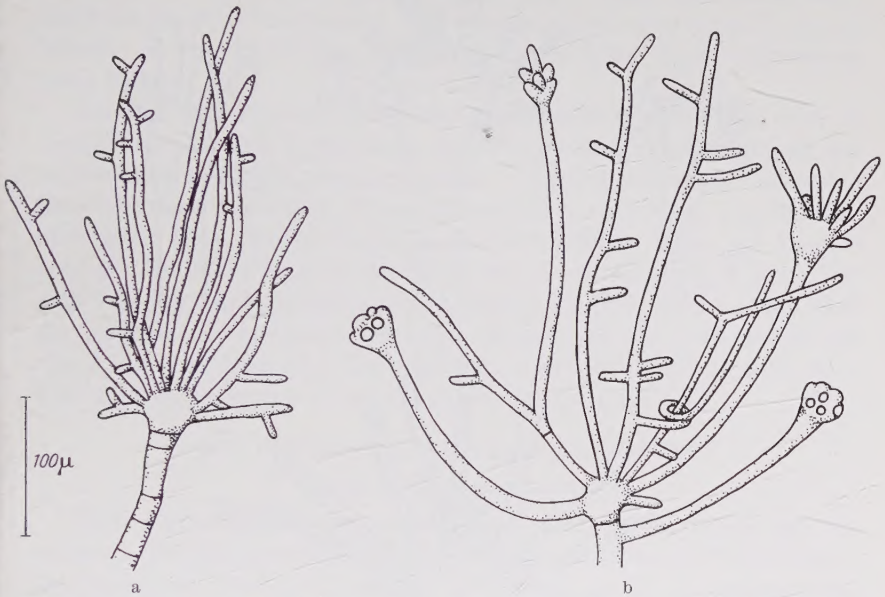


Abb. 3a und b. Proliferierte Conidienträger von *Aspergillus amstelodami* im Nährboden (Frischpräparat). a Ältere Proliferation; b Conidienträger mit proliferierten Sterigmen und Anlage von Sekundärköpfchen und Ascogonen

Stämmen bestätigen. Lediglich solche Conidien, an deren gequollener Wand bereits der Keimungsbeginn zu erkennen war, enthielten mehrere Kerne. Auch die Sterigmen besaßen stets nur einen Kern (Abb. 4a und 4b). Zweikernige Sterigmen waren nur dort zu beobachten, wo die Abschnürung der Conidien bereits begonnen hatte.

Kerne, die sich beim Einwandern gerade in dem Kanal zwischen Sterigme und Conidie bzw. zwischen Endblase und Sterigme befanden, waren länglich keulenförmig gestaltet. Dabei konnte in Analogie zu den von Baker beschriebenen Arten mit einkernigen Sterigmen auch hier niemals die Einwanderung eines zweiten Kernes von der Endblase in eine Sterigme beobachtet werden. Meist hatten die Sterigmen bereits ihre volle Größe erreicht, wenn der Kern in der Durchtrittsöffnung zu

sehen war. Aber auch Kerne, die sich offensichtlich auf einen Ort gesteigerten Kernbedarfs zubewegten, z. B. in eine Endblase mit beginnender Sterigmenbildung, hatten eine ähnliche keulenförmige Umgestaltung erfahren. Die Kernstruktur stellte sich im Lebendpräparat anders dar als am fixierten. Im Phasenkontrast erschienen die Kerne, ähnlich wie sie GIRBARDT (1955) bei *Polystictus* gesehen hat, als helle, meist ovale bis

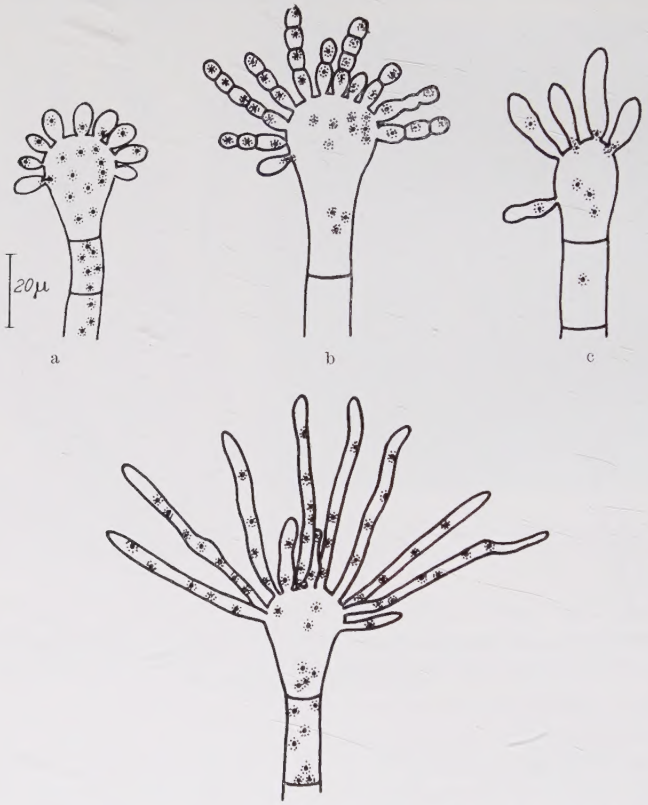


Abb. 4a—d. Conidienträger von *Aspergillus amstelodami* nach Hämatoxylinfärbung. a Einwanderung der Kerne in die Sterigmen eines jungen normalen Conidienträgers. b Normaler Conidienträger mit reifen Conidien. c Conidienträger mit proliferierten Sterigmen im Nährboden, Einwanderung der Kerne in die Sterigmenproliferationen. d Ältere Proliferation im Nährboden. Vermehrung der Kerne in den proliferierten Sterigmen

runde, zuweilen spindelförmig ausgezogene Gebilde mit einem sehr dunklen, meist runden Zentrum. Am wandernden Kern war auch diese dunkle Innensubstanz fadenförmig ausgezogen. In fixierten und gefärbten Präparaten waren die Ruhekerne gleichmäßig dunkel gefärbt. Kerne, die sich vermutlich im Endstadium einer Teilung befanden, zeigten stets

wieder zwei dunklere Körper, verbunden durch eine Brücke schwächer gefärbter Substanz. Die Gestaltveränderungen wandernder Kerne scheint die notwendige Folge der an dem zähflüssigen Kernmaterial während der Bewegung ansetzenden Kräfte zu sein. Bei *Basidiomyceten* sind solche lang ausgezogenen Wanderkerne von Ruhland (1901) und Girbardt (1958) beobachtet worden. Baker (1945) spricht bei *Asp. fumigatus* und *Asp. clavatus* vom Dünnerwerden des Kernes beim Passieren des Konnektivs zwischen Sterigme und Conidie. Sie betont aber, daß beim gleichen Vorgang bei *Asp. repens* der Kern seine normale Gestalt behielt, da die Breite des Durchtrittsweges keine Formveränderung nötig machte.

An den proliferierten Conidienträgern unserer Art ließen sich in Gestalt, Größe und Färbbarkeit des Kernes und der Ausbildung der mutmaßlichen Teilungsstadien keine Unterschiede zum normalen Conidienträger feststellen. Ganz offensichtlich läuft auch die Einwanderung der Kerne in die Sterigmen in gesetzmäßiger Weise ab: Es wird von der Endblase an jede Sterigme nur je ein Kern abgegeben. Wie Abb. 4c zeigt, sind die Sterigmen in diesem Stadium jedoch schon über die normale Größe hinaus gestreckt. Haben die Sterigmenmorphosen eine Länge von etwa 20 μ überschritten, dann erhöht sich die Zahl ihrer Kerne durch Teilungen innerhalb der Sterigmen (Abb. 4d).

Zur Physiologie der Sterigmenproliferation

I. Wasserstoffionenkonzentration

Nach Vorversuchen mit verschiedenen Nährböden zeigten sich die meisten Sterigmenproliferationen auf dem „Perithecien-Nährboden". Da dieser einen recht niedrigen p_H-Wert besitzt, lag die Vermutung nahe, daß die Acidität der Nährlösung hier einen ähnlichen Einfluß auf die Zellwand ausübt, wie er aus den Untersuchungen über die Bildung sogenannter Riesenzellen von vielen Pilzen bekannt ist (Brefeld 1873; Ritter 1907 und 1913; Wehmer 1913a und b; Frey 1927; Barnes 1928; Drawert u. Müller 1953). Bei der Riesenzellbildung entstehen nahezu amorphe Formen (Abb. 5). Ihre Gestalt scheint vorwiegend durch physikalische Kräfte bedingt zu sein; dennoch ist primär ein Zellwandeffekt der cH zu vermuten, der ähnlich bei der Bildung von Sterigmenproliferationen vorliegen könnte.

Zur Untersuchung des Einflusses der Wasserstoffionenkonzentration auf die Bildung von Sterigmenproliferationen wurden Nährböden („Peritheciennährlösung" und 5%ige Maltzinlösung) unterschiedlichen p_H-Wertes mit zwei verschiedenen Pufferreihen hergestellt: Glykokollpuffer (m/100) nach Sörensen (1931) und Phosphatpuffer (m/150) nach Strugger (1949). Bei p_H 1,6 keimten die Sporen nicht. Bei Werten um p_H 9 war die Keimung zwar verzögert, nach einigen Tagen entwickelte

sich der Pilz jedoch auch auf diesen Nährböden normal. Es ließ sich nicht nachweisen, daß die cH die Größe der Kolonien beeinflußte. Nach den Bestimmungen des Trockengewichts zeigte sich ebenfalls keine Abhängigkeit des Wachstums von der Wasserstoffionenkonzentration. In

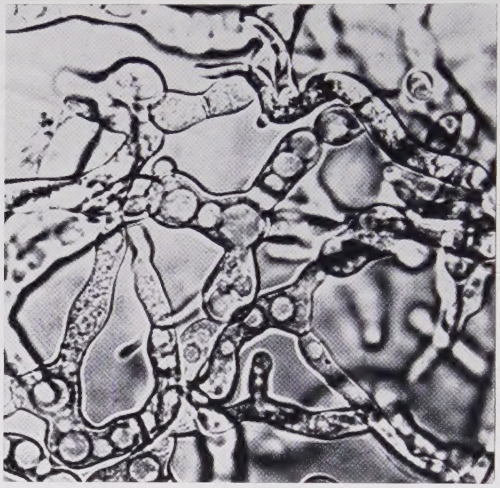


Abb. 5. Durch Säureschädigung entstandene „Riesenzellen" am Mycel von *Aspergillus amstelodami* (Frischpräparat)

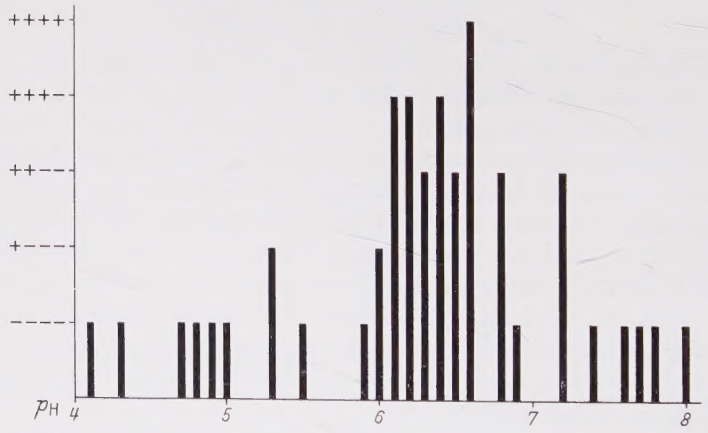


Abb. 6. Abhängigkeit der Sterigmenproliferation von der Wasserstoffionenkonzentration. Zeichenerklärung: (—) Hyphen im Nährboden ohne Morphosen. (+) proliferierte Sterigmen im Nährboden

festen und flüssigen Nährböden bilden sich Proliferationen bevorzugt bei einem pH von etwa 6,5 (Abb. 6). In den Nährlösungen entstehen am Bodenmycel, das sich in allen Kölbchen wenigstens in den ersten Tagen in Form von dicken weißen Flocken auf dem Boden liegend bildet, keine

Proliferationen. Diese treten an der auf der Oberfläche schwimmenden Pilzdecke dicht unter der Flüssigkeitsoberfläche auf. Die bei diesen Versuchen beobachteten Sterigmenmorphosen waren immer von Nährlösung umgeben.

Bei den gepufferten Nährlösungen ergaben sich während der Versuchszeit erhebliche Änderungen der Wasserstoffionenkonzentration gegenüber den Anfangswerten (Tab. 1). Laufende Kontrollen des p_H-Wertes während der Kultur auf „Peritheciennährlösung" zeigten bei

Tabelle 1. *Verschiebung der p_H-Werte während der 22tägigen Kultur in der „Peritheciennährlösung" mit Glykokollpuffer*

Anfangs-p_H	End-p_H	Anfangs-p_H	End-p_H
3,0	5,3	6,0	5,7
4,2	6,3	6,4	6,1
4,8	5,0	7,3	7,7
5,0	5,4	8,8	6,2
5,4	5,5		

einem Anfangswert von p_H 4,25 zunächst einen Anstieg auf p_H 5,4. Vom 12. Kulturtage an sank der p_H-Wert der Nährlösung kontinuierlich ab. Die ersten Sterigmenproliferationen im Nährboden traten am 8. Tage auf, zu dem Zeitpunkt also, zu dem ein p_H-Wert von etwa 5,3 überschritten wurde. Dieser Verlauf der p_H-Verschiebung gilt jedoch nur für den „Peritheciennährboden" mit einem recht niedrigen Anfangs-p_H-Wert. Bei einer 4%igen Maltzin-Leitungswassernährlösung mit einem Anfangs-p_H-Wert von 5,6 steigt die Acidität im Nährboden sofort an. Die bei den ersten Kontrollen bis zum 9. Tage beobachtete Entstehung von Morphosen ist am 11. Tage nicht mehr festzustellen. Bei Zusatz von 4% Tween 80 hatte die Nährlösung den gleichen Anfangs-p_H-Wert von 4,25 wie die „Peritheciennährlösung" ohne Tween. Jedoch fand sich hier am 5. Tag noch ein fast unverändert saures Medium, das Mycel war nicht nur stark vacuolisiert, sondern hatte auch Riesenzellen gebildet. Es lag in Flocken auf dem Boden der Kölbchen und zeigte keinerlei Differenzierung. Erst am 11. und 12. Tag entstand Luftmycel mit vereinzelten Ascogonschrauben. Nun begann auch die Acidität zurückzugehen. Am 18. Tag ergab sich ein p_H-Wert von 5,2, gleichzeitig wurden die ersten vereinzelten Proliferationen am Rande des Luftmycels erkennbar. Obwohl eine Veränderung des Stoffwechsels auf Grund der lange anhaltenden Bildung von Bodenmycel und durch den Tween-Zusatz anzunehmen ist, traten auch hier die Sterigmenproliferationen erst auf, als die Grenze von p_H 5,2 überschritten war (Abb. 7).

Tween 80 soll als nichtionisches Netzmittel im Gegensatz zu den ionischen Netzmitteln keine Schädigung wie Denaturierung, Präcipitation und Komplexbildung am Eiweiß hervorrufen. Es setzt die Oberflächenspannung des Wassers bei

einer Temperatur von 25° C und einem Gehalt von 1% von 72 auf 40 dyn/cm herab und ist im Vergleich zu anderen Netzmitteln sehr wirksam (Glassmann 1948).

Daß eine entsprechende Veränderung des pH-Wertes während der Kultur auch in Agar-Nährböden stattfindet, konnte durch Zusatz von 1% Universalindicator Merck an Hand der Färbung des Nährbodens festgestellt werden. Auf Nährböden, deren Anfangs-cH über oder unter

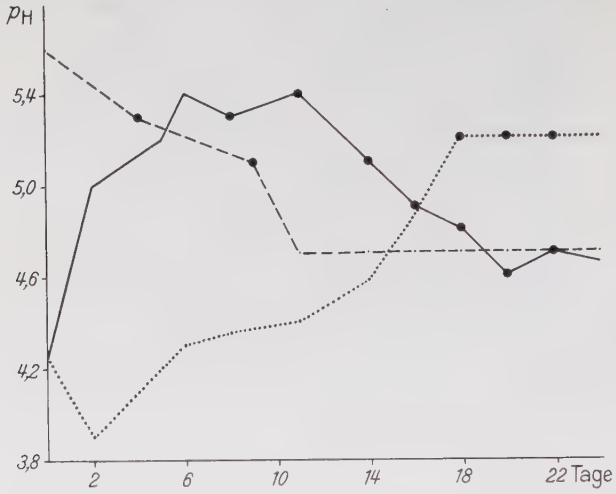


Abb. 7. Verschiebung des pH-Wertes während der Kultur auf verschiedenen Nährböden: „Peritheciennährlösung" = ausgezogene Linie, „Peritheciennährlösung" mit 4% Tween 80 = punktiert, 4% Maltzin + Leitungswasser = gestrichelte Linie. Die durch • markierten Punkte bezeichnen das Auftreten von Sterigmenproliferationen

der für Proliferationen günstigen Größenordnungen lagen, blieben die Morphosen meist nicht ganz aus, sondern traten einige Tage später auf. Da eine pH-Verschiebung während der Kultur stattfindet, läßt sich auch dieses verspätete Auftreten der Morphosen erklären.

Bei Deckglas- und Objektträgerkulturen sowie in Petrischalen mit ungewöhnlich dünnen Nährbodenschichten (3 mm = 15 cm³ Nährboden, 2 mm = 10 cm³) traten Proliferationen außerordentlich schnell, meist schon am 1. Tag auf. Sicherlich ist auch hierfür die Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration im Nährboden durch den Pilz verantwortlich zu machen. Je weniger Salze zur Aufnahme zur Verfügung stehen, desto schneller verändert sich der Stoffwechsel des Pilzes und damit die cH-Lage des Nährbodens. Diese Reaktionsänderungen können hervorgerufen sein durch bevorzugte Aufnahme der Nitrat-Ionen, durch Säurebildung oder durch selektive Kationenaufnahme (Gladke u. Brucker 1958).

Die submersen Morphosen der Sterigmen treten vereinzelt schon bei einem p_H-Wert von 5,2, gehäuft aber immer erst im Bereich der p_H-Werte 6,0—6,8 auf. Im sauren Medium beobachtet man regelmäßig die Bildung von Vorstadien der Proliferationen. Es finden sich Hyphen im Mycel, die breiter sind als die normalen vegetativen Hyphen. Manche zeigen eine blasige Auftreibung an der Spitze, die in Größe und Form der Endblase eines normalen Conidienträgers völlig gleicht. Ist der Nährboden stark gepuffert oder die Pilzkolonie schon so alt, daß die Acidität des Nährbodens ansteigt, so bleiben diese Bildungen entweder stecken oder sie wachsen weiter als anomal breite Hyphen, ohne Sterigmen anzulegen. Geht die Acidität jedoch zurück, so entstehen aus diesen Anlagen Sterigmen, die proliferieren. Kulturen auf Nähragar oder Nährlösungen, deren p_H-Wert unter 5 liegt, zeigen Riesenzellbildung (Abb. 5). Die Riesenzellen entstehen meist an Stellen, an denen das Pilzmycel besonders dicht gewachsen ist. Weniger auffällig als die Riesenzellen sind die Veränderungen, die in alkalischem Medium an den Hyphen zu beobachten sind. Wird der Pilz auf Nährböden von p_H 8 kultiviert, so läßt sich nach einer etwas verzögerten Keimung ein Mycel beobachten, das stark verzweigte fast knorpelige Hyphen besitzt.

Beginnt das Wachstum der Kolonien am 12. Tage auf Agarnährböden zu stagnieren, so zeigt sich in p_H-Lagen, die sonst die Morphosen begünstigen, ein verändertes Bild. Es werden zwar noch Conidienträger im Agar angelegt, jedoch bleiben diese auf die Endblasen beschränkt. Diese schon erwähnte Bildung von steckengebliebenen Conidienträgern scheint eine Begleiterscheinung der alternden Kolonien zu sein. Deshalb treten auch an Kolonien, deren Wachstum bereits nachzulassen beginnt und die durch ihre Stoffwechseltätigkeit den p_H-Wert des Nährbodens erst nach längerer Zeit aus einem sehr niedrigen p_H-Bereich in eine für Proliferationen günstige cH-Lage verschoben haben, keine Proliferationen mehr auf, sondern nur noch steckengebliebene Conidienträger. Haben sich jedoch auf diesen Platten durch Aussaat von der alten Kolonie junge Mycelien gebildet, so bringen diese stets zu diesem Zeitpunkt üppige Sterigmenproliferationen hervor. Auch in der Bildung der normalen Fruchtformen (Conidienträger und Perithecien) ist *Asp. amstelodami* vom p_H-Wert des Nährbodens beeinflußbar. Bei p_H-Werten unter 6 erscheinen die Kolonien völlig gelb (Perithecien), während sie im neutralen und alkalischen Bereich sich zunehmend blaugrau färben (Conidien). Diese Beobachtung machte auch Schönborn (1955) bei Untersuchungen an seinem Stamm. Die mikroskopische Prüfung zeigt, daß meist beide Fruktifikationsformen nebeneinander auftreten und nur die eine oder die andere in überwiegendem Maße gebildet wird. Im p_H-Bereich zwischen 4 und 8 ist der Pilz auf den verwendeten Nährböden fähig, Perithecien neben Conidien zu bilden. Zwischen p_H 2 und 4 sind auch mikroskopisch

nur Perithecien festzustellen. Sinkt der p_H-Wert des Nährbodens während der Kultur unter p_H 2 ab, wird das ganze Mycel steril.

Da die cH einen Einfluß auf die Ionenaufnahme ebenso wie auf die Wirksamkeit komplexer Verbindungen, auf kolloidchemische Vorgänge, auf den Einbau von Chitin in die Zellwand (Behr 1930) und auf die Atmung (Bhatnangar u. Krishnan 1959) hat, ergibt sich die Frage, durch welchen Mechanismus sich die Unterschiede der Wasserstoffionenkonzentration auf das Zellwandwachstum des Pilzes auswirken.

II. Mangelkulturen

Im Hinblick auf den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Verfügbarkeit der Nährstoffe für den Pilz, erschien es wünschenswert, die Reaktion des Pilzes auf das Fehlen einzelner, in der Schönbornschen Nährlösung gebotener Ionen festzustellen.

Kohlenstoff. Auf Nährböden ohne Rohrzucker entwickelte sich aus den in den Sporen vorhandenen Reservestoffen ein spärliches Mycel ohne Conidien und Perithecien, das bereits am 6. Tage abzusterben begann. Der p_H-Wert lag bei 5. Der geringe Stoffwechsel reicht nicht aus, die cH-Lage so weit zu verändern, daß der für die Sterigmenproliferation günstige Bereich erreicht wird. Auf Czapek-Dox-Agar ohne Zucker bildeten sich bald, wenn das Wachstum auch sehr schwach war und nach kurzer Zeit ganz aufhörte, sehr üppige Sterigmenproliferationen im Nährboden. Da Czapek-Dox-Agar ohne Zucker einen p_H-Wert von etwa 6,8 hat, ist anzunehmen, daß der Pilz in diesem Nährboden den für die Morphosen geeigneten p_H-Wert findet. An Stelle von Rohrzucker kann auch Maltzin als Kohlenstoffquelle dienen; da diese Nährböden eine höhere Acidität haben, tritt hier die Proliferation später und in geringerem Maße ein. Unabhängig von der Reaktion des Nährbodens wuchsen alle drei untersuchten Stämme von *Asp. amstelodami* stets besser auf Maltzin als auf Rohrzucker. Ähnliche Beobachtungen machten Boas (1919) für *Asp. niger* mit Maltose und Rohrzucker und Thielke (1958) für *Asp. repens* ebenfalls mit Maltzin und Rohrzucker. Eine Beziehung zwischen Wüchsigkeit und der Bildung von Morphosen im Nährboden etwa als Ausdruck eines Hungerwachstums kann aber auf Grund der vergleichenden Untersuchungen mit beiden Zuckerarten ausgeschlossen werden. Bei Verwendung von Glucose lag der p_H-Wert des Nährbodens bei 3,95. Sterigmenproliferationen bildeten sich nicht. Diese Tatsache muß wohl auf die zu hohe Acidität des Nährbodens zurückgeführt werden.

Stickstoff. Auf stickstofffreiem Medium („Peritheciennährlösung" ohne KNO_3, p_H 5,4) wuchs der Pilz, wie zu erwarten war, sehr schlecht. Das Mycel war mit bloßem Auge kaum zu sehen. Am 6. Tag bildeten sich ganz wenige aber normal gestaltete Conidienträger und Perithecien,

wobei letztere zahlenmäßig überwogen. Am 19. Tage entstanden schließlich ganz vereinzelt Proliferationen. Diese scheinen also auch unter Stickstoffmangel möglich zu sein.

Phosphor. In den Phosphor-Mangelkulturen („Peritheciennährboden" ohne KH_2PO_4) fiel auf, daß bereits am 4. Tage neben normalen Fruktifikationsorganen über dem Nährboden recht häufig Sterigmenproliferationen und bereits sekundär verzweigte Proliferationen im Medium selbst wahrzunehmen waren. Dabei blieben die Kolonien sehr klein und das Mycel sehr dünn. Die Bildung von Proliferationen hielt fast 3 Wochen an, die Formen wurden immer unregelmäßiger. Besonders zahlreich traten submerse Sekundärverzweigungen der Sterigmen auf. Am 11. Tage zeigten sich zum ersten Mal neben üppigen Sterigmenproliferationen im Nährboden auch an den normalen Conidienträgern starke Verzweigungen der Sterigmen mit ausgereiften Conidien. Den Proliferationen im Nährboden fehlte meist die Endblase, oft blieben die Conidienträger stecken. Die Zahl der abnormen Conidienträger über dem Nährboden nahm laufend zu, es reiften trotz unregelmäßiger Bildung der Sterigmen immer noch normale Conidien heran.

Kalium. Nach Kaliummangel (K-Salze wurden durch entsprechende Na-Salze ersetzt) entstanden normale Hyphen, die Kolonien blieben klein und erzeugten nur wenige Conidienträger. Proliferationen traten auch nach 20 Tagen nicht auf. Der Anfangs-p_H-Wert hatte 5,5 betragen. Vermutlich sank der p_H-Wert am Ende der Kultur stark ab, denn es bildeten sich vom 15. Tage an Riesenzellen.

Magnesium. Auf Magnesium-Mangelnährböden (p_H 6,0) trat die Conidienbildung sehr hinter der Perithecienbildung zurück. Das Wachstum war jedoch sehr kräftig. Vom 6. Tage an proliferierten die Kolonien üppiger als die Kontrollen. Da Magnesiumsalze im neutralen Bereich langsamer absorbiert werden als im sauren (Steinberg 1945) und bei hohen p_H-Werten ganz ausfallen (Fries 1945), könnte bei der p_H-Abhängigkeit der Proliferationen eine Magnesium-Mangelerscheinung vorliegen. Das wäre um so leichter denkbar, da Magnesium für die Zellteilung von Bedeutung sein soll (Webb 1951). Fiedler (1959) beobachtete an *Asp. niger* unter Magnesiummangel die Entstehung auffallend langer Zellen. Die Grenzflächen der Hyphen waren zart und durchsichtig.

Schwefel. Die Schwefel-Mangelkulturen hatten ein ähnliches Aussehen wie die stark gelb gefärbten Magnesium-Mangelkulturen. Nur war das Mycel nicht ganz so dicht und kräftig. Proliferationen entstanden im gleichen Maße wie auf den Kontrollplatten.

Eisen. Die Eisen-Mangelkulturen unterschieden sich nur durch reduzierte Conidienbildung von den Kontrollen, eine Tatsache, die von *Asp. niger* bereits bekannt war (siehe Hawker 1950, S. 71). Vermutlich

war es auch mit der verwendeten Methode nicht möglich, Eisen gänzlich auszuschließen.

III. Hydratur

Bei *Asp. repens* lassen sich Sterigmenproliferationen am Luftmycel durch erhöhte Luftfeuchtigkeit erzeugen. Die Neigung zu Proliferationen geht zurück, sobald höhere Zuckerkonzentrationen geboten werden (Thielke 1957, 1958). Es sollte daher untersucht werden, inwieweit die Proliferationen auch bei *Asp. amstelodami* von dem Wassergehalt und der Konzentration des Nährmediums sowie von der Luftfeuchtigkeit abhängig sind.

Verschiedene Agarkonzentrationen (3, 6 und 8%) beeinflußten die Wüchsigkeit des Pilzes nicht; die Kolonien waren in Größe und Aussehen gleich. Auf allen Nährböden entstanden Kolonien, die bereits am 2. Tage Proliferationen hervorbrachten. Doch besaßen bei 6 und 8% Agar vornehmlich die Substrathyphen zahlreiche Verzweigungen und die charakteristischen knorrigen Formen, die auch Heintzeler (1939) für das Submersmycel von *Phycomyces* und anderer bei geringer Dampfspannung beschreibt. Ebenso regelmäßig entstanden Sterigmenmorphosen in Nährböden mit 10, 20, 30 und 40% Gelatine. In der morphologischen Ausbildung der Hyphen waren hier jedoch nicht solche ausgeprägten Unterschiede wie bei den verschiedenen Konzentrationen der Agarnährböden festzustellen.

Die Hydratur eines Nährbodens erniedrigt sich mit Zunahme des osmotischen Wertes, z.B. durch erhöhte Zuckerkonzentrationen. *Asp. amstelodami* bildet die meisten Proliferationen bei einem Zuckergehalt des Nährbodens von etwa 3%. Bei höheren Konzentrationen, etwa bei 10% Zucker sind schon weit seltener Proliferationen zu finden (Tab. 2). Da analoge Erscheinungen bei *Asp. repens* aufgetreten waren (Thielke 1958), wurde der Einfluß der Zuckerkonzentration auf die Sterigmenproliferationen auf verschiedenen Nährböden untersucht (1. Saccharose + „Peritheciennähragar", 2. Maltzin + Leitungswasser, 3. Maltzin + Leitungswasser + Agar, 4. Maltzin + „Peritheciennähragar"). Diese Versuche ergaben in guter Übereinstimmung eine optimale Zuckerkonzentration für die submersen Sterigmenmorphosen unseres Pilzes bei etwa 4%. Die Tabelle zeigt, daß bei einer Rohrzuckerkonzentration über 10% in der Regel keine Proliferationen mehr auftraten. Das gilt auch für die Maltzinnährböden. Hier nimmt jedoch mit steigender Konzentration auch die Größe der Kolonien zu, so daß bei 30% Maltzingehalt die kräftigsten Kolonien entstanden. Dagegen ließ die Wüchsigkeit auf „Peritheciennährböden" mit Konzentrationen von über 20% Rohrzucker sehr nach. Die Kolonien besaßen zwar eine relativ große Ausdehnung, das Mycel war jedoch spärlich mit wenigen Conidienträgern und

Perithecien. Das Auftreten von Sterigmenproliferationen war offenbar nicht von der Wachstumsrate, sondern lediglich von der Zuckerkonzentration abhängig.

Auf Maltzin- und Rohrzuckersubstraten ohne Agar nahm die cH mit steigender Konzentration erheblich zu. Um zu vermeiden, daß der für die Proliferation der Sterigmen geeignete p_H-Bereich gar nicht durch-

Tabelle 2. *Abhängigkeit der Sterigmenproliferationen von der Zuckerkonzentration* „Peritheciennährboden" mit Saccharose und 1,5% Agar

% Saccharose	p_H	2. Tag	4. Tag	7. Tag	9. Tag	11. Tag	14. Tag
0	5,0	————	————	————	————	————	————
2	5,0	+ + — —	+ + — —	+ + — —	+ + — —	+ — — —	+ — — —
4	5,0	+ + — —	+ + + —	+ + + —	+ + + —	+ + + —	+ + + —
6	5,0	+ + + —	+ + — —	+ — — —	+ + — —	+ — — —	————
8	5,0	+ + — —	+ + — —	+ — — —	+ — — —	+ — — —	————
10	5,0	+ — — —	+ + — —	+ + — —	+ — — —	————	————
20	5,0	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
30	5,0	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
40	5,0	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —

Zeichenerklärung: (— — —) = Conidienträger ohne Morphosen; (+ + +) = Conidienträger mit proliferierten Sterigmen im Nährboden; (— — —) = keine Conidienträger.

laufen wird und so eine Bildung von Morphosen von vornherein ausgeschlossen ist, wurden die gewonnenen Ergebnisse auf gepufferten Nährböden nachgeprüft. Auch auf diesen Nährböden entwickelten sich Sterigmenmorphosen wieder bevorzugt auf den 4% Zucker enthaltenden Substraten, traten bei 10% nur ganz selten auf und blieben bei 30% ganz aus. Das Fehlen der Proliferationen auf hochkonzentrierten Nährböden ist also nicht nur auf den zu Beginn der Kulturen erniedrigten p_H-Wert zurückzuführen, sondern auch auf die verringerte Hydratur.

In wasserdampfgesättigter Atmosphäre ist *Asp. amstelodami* nicht befähigt, Proliferationen zu bilden, wie sie Thielke (1958) bei *Asp. repens* erhalten hat. Zur Erzeugung von Proliferationen scheint Kontakt mit einem flüssigen Medium notwendig zu sein.

IV. Sauerstoffmangel

Da sich bei den Kulturen von *Asp. amstelodami* auf flüssigen Nährböden Proliferationen nur am schwimmenden Mycel bildeten, während am Bodenmycel niemals ähnliche Morphosen auftraten, lag die Vermutung nahe, daß Sauerstoff hier als regulierender Faktor wirken könnte. Daher wurde der Pilz unter erniedrigter Sauerstoffspannung kultiviert.

Zur Bestimmung des Sauerstoff-Restgehaltes im Exsiccator verwendete ich ein Gerät zur Anzeige des Sauerstoffs in der Gasphase (Küster 1960) nach der

elektrochemischen Meßmethode von Tödt. Als Meßinstrument diente ein Zeigergalvanometer mit einer Empfindlichkeit von 0 01 μ A/Skalenteil (Fa. Dr. B. Lange). Die relative Feuchte im Exsiccator betrug 95%. Ich nahm den Exsiccator nur zur Einleitung des Stickstoffs aus dem Brutschrank, sonst wurde er bei 28° C aufbewahrt. Da der Exsiccator nicht gänzlich abzudichten war und das Gerät nach 24 Std jeweils eine Erhöhung des absoluten Sauerstoffgehalts um etwa 2% anzeigte, leitete ich täglich Stickstoff zu, ohne daß jedoch der Exsiccator geöffnet wurde. Die Petrischalen standen ohne Deckel im Exsiccator.

Vorversuche mit Pyrogallol als Sauerstoffabsorbens (Janke 1946) zeigten, daß bei Sauerstoffmangel (etwa 2—8% Sauerstoffgehalt) zunächst nur vegetatives Mycel, zum größten Teil als wattiges Luftmycel entstand. Das Wachstum der Kolonien war gegenüber den Kontrollen deutlich gehemmt. Nach 9 Tagen bildeten sich bei einer Serie an allen Kolonien über dem Nährboden Conidienträger mit proliferierten Sterigmen, zum Teil mit Sekundärköpfchen, an Stelle normaler Conidienträger. In einer weiteren Serie wurden Kulturen in einem Exsiccator mit Stickstoff begast. Hier zeigten sich bereits am 3. Tage neben normalen Conidienträgern sehr häufig Proliferationen am Luftmycel.

Da aus den Vorversuchen das relativ geringe Sauerstoffbedürfnis des Pilzes hervorging, ließ ich die frisch beimpften Platten zunächst in Stickstoff-Sauerstoffgemischen mit 10, 5, 3 und 2% Sauerstoff keimen. Während sich bei 10, 5 und 3% normale Kolonien entwickelten, keimten bei 2% Sauerstoff nur etwa 10% der Sporen. Auch diese kurzen Hyphen wuchsen nicht weiter. Kulturen, die sich bei einem Sauerstoffgehalt von 3% entwickelten, hatten zwar einen kleineren Koloniedurchmesser als die Kontrollen, besaßen aber noch normal ausgebildete Conidienträger und Ascogone sowie submerse Sterigmenproliferationen. Bessere Ergebnisse konnten mit vorgekeimten Kolonien erzielt werden. 2—4 Tage alte Kolonien wuchsen in einer Stickstoffatmosphäre mit einem Restgehalt von 2% Sauerstoff verlangsamt weiter und bildeten stets neben normalen Conidienträgern mit erniedrigter Sterigmen- und Conidienzahl eine Anzahl Conidienträger mit proliferierten Sterigmen am Luftmycel. Im Substrat entstanden Proliferationen unter diesen Bedingungen nicht. Ebensogut ließen sich Proliferationen am Luftmycel erzielen, wenn die Sporen bei etwa 3% Sauerstoff keimten und 24 Std später durch erneutes Einleiten von Stickstoff soweit wie möglich anaerobe Verhältnisse geschaffen wurden. Am 4. Tage nach der Impfung waren stets proliferierte Conidienträger am Luftmycel zu beobachten.

Zum Vergleich wurde auch ein Stamm von *Asp. repens* herangezogen, der sehr zur Bildung proliferierter Conidienträger am Luftmycel neigt. Diese Morphosen treten jedoch auf konzentrierten Zuckernährböden (20 –30%) im Luftsauerstoff nicht auf. In der Stickstoffatmosphäre bildeten sich jedoch in 40 Versuchen auf 30%igem Maltzinagar auch bei diesem Pilz zu etwa 20% Conidienträger mit proliferierten Sterigmen am

Luftmycel. Allerdings machte die Natur dieses Stammes und wohl vor allem auch die andere Hydratur des Nährbodens eine erhöhte Dosierung des Sauerstoffs notwendig. Deshalb ist es günstiger, wenn *Asp. repens* zunächst unter aeroben Verhältnissen keimt (1 Tag), am nächsten Tag noch 10% Sauerstoff bekommt und dann unter anaeroben Verhältnissen weiterwächst.

Daß Sauerstoffmangel vornehmlich die Keimung und die Sporenbildung hemmt, ist für *Asp. niger* durch Porodko (1904) bekannt geworden. Auffallend ist der grundsätzlich recht geringe Sauerstoffbedarf der Schimmelpilze. Neben *Asp. niger*, der bei 0,66% Sauerstoff noch wachsen soll (Porodko), sei noch *Penicillium roquefortii* genannt, dessen Wachstum erst durch Erniedrigung des Sauerstoffgehaltes über dem Nährboden auf Werte unter 2,1% sistiert wird (Miller u. Golding 1949). Es wird allgemein angenommen, daß durch diesen geringen Sauerstoffpartialdruck der Stoffwechsel völlig umgestellt wird (Diakonow 1886; Dude 1903; Hawker 1950).

V. Licht

Auf 20 und 30%igem Maltzinagar hatten sich wiederholt auffallende durch Conidien olivgrün gefärbte Ringe auf dem von Perithecien gelblich gefärbten Pilzrasen der Kolonien gebildet. Die Zahl der Ringe stimmte stets mit der Anzahl der vorangegangenen mikroskopischen Untersuchungen überein. Dabei waren die geöffneten Petrischalen zumeist bei Tageslicht auf dem Objekttisch des Mikroskops untersucht worden. Umfangreiche Versuche bestätigten den Verdacht, daß die Ringbildung durch den Rhythmus der Beleuchtung induziert wird. Im Dauerlicht sowie im Dauerdunkel werden keine Ringe gebildet. In dieser Hinsicht entspricht das Verhalten von *Asp. amstelodami* dem anderer Schimmelpilze (Sagromsky 1952, 1959). Wenn auch stets zu beobachten war, daß der Lichtfaktor das quantitative Verhältnis von Perithecien zu Conidien wesentlich beeinflussen konnte (Förderung der Conidienbildung im Dauerlicht), für die Entstehung der Sterigmenproliferation hatten die mannigfach variierten Lichteinwirkungen keine Bedeutung.

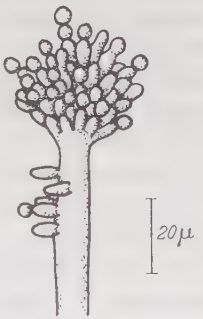


Abb. 8. *Aspergillus amstelodami.* Bildung von Sterigmen unterhalb der Endblase unter Einfluß von Dauerlicht

Unter Dauerlicht (5000 Lux) entstanden allerdings auf „Perithecienährboden" und auf 5%-Maltzinagar veränderte Conidienträger. Ihre Köpfe besaßen eine größere Zahl von Sterigmen. Sehr oft waren noch unterhalb der Endblase am Trägerstiel zusätzliche Sterigmen aus-

gebildet, die Conidien hervorbrachten (Abb. 8). Diese „Photomorphose" konnte auf dem 30%igen Maltzinnährboden jedoch nicht beobachtet werden. Christensen u. Mitarb. (1959) beschreiben die gleiche Erscheinung für *Eurotium halophilicum* sp. nov. Sie geben aber für die Entstehung dieser Morphosen keine Ursache an.

Diskussion

Im Verlauf der Untersuchungen stellte sich heraus, daß die Entwicklung der Sterigmenproliferationen im Nährboden bei *Asp. amstelodami* an den p_H-Bereich von etwa 6,0—6,8 gebunden ist, wobei die Zuckerkonzentration 10% nicht überschreiten darf. Sterigmenmorphosen über dem Nährboden entstehen nur bei extrem niedriger Sauerstoffspannung. Innerhalb einer Kolonie ist der Raum — die oberste etwa $^1/_2$ mm tiefe Schicht des Nährbodens —, in dem die Sterigmenproliferationen bei Luftzutritt gebildet werden, sehr eng begrenzt. Nur in diesem Bereich sind sowohl in festen als auch in flüssigen Nährböden Proliferationen zu finden, obwohl das Submersmycel viel tiefer in den Nährboden eindringt. Neben den Sterigmenproliferationen bilden sich unter der Nährbodenoberfläche unter den gleichen Bedingungen auch Ascogone, die niemals zu Perithecien heranreifen. An Kolonien, an denen sich submerse Sterigmenproliferationen entwickeln, können wir also drei Myceltypen unterscheiden: einmal das Luftmycel mit normalen Conidienträgern und Perithecien, zum andern das Mycel unter der Oberfläche des Substrats mit Anlagen zu Conidienträgern und Perithecien, deren Sterigmen und Ascogone sich aber zu sterilen Hyphen umbilden, und als unterste Schicht das sterile Mycel in der Tiefe des Substrats. Diese Anordnung deutet darauf hin, daß ein oder mehrere Faktoren auf das Mycel einwirken, deren Gefälle von der Oberfläche der Kolonie bis ins Innere des Substrats diese verschiedenen Wuchsformen bewirken. Weder die Wasserdampfspannung über dem Nährboden noch die Einwirkung des Lichts auf die Kolonie können die Entstehung von Proliferationen beeinflussen, obwohl die Sporulation von der Belichtung deutlich abhängig ist.

Dagegen weisen verschiedene Ergebnisse darauf hin, daß die Sauerstoffspannung in und über dem Nährboden einen wesentlichen Einfluß auf die Entwicklung der verschiedenen Wuchsformen hat. Diese Vermutung wird vor allem gestützt durch die Tatsache, daß sowohl *Asp. amstelodami* als auch *Asp. repens* durch erniedrigte Sauerstoffspannung zu Sterigmenproliferationen über dem Nährboden veranlaßt werden. 2—4 Tage alte Mycelien von *Asp. amstelodami* sind befähigt, unter nahezu anaeroben Verhältnissen weiterzuwachsen und Conidienträger und Ascogone anzulegen. Der Stoffwechsel wird also auch in der reinen Stickstoffatmosphäre aufrechterhalten. Tomlinson (1937) konnte zeigen, daß bei

Asp. niger, Asp. tamarii und *Asp. oryzae* auch während der Anaerobiose die CO_2-Abgabe — wenn auch vermindert — aufrechterhalten wird. Flieg (1922), der ähnliche Ergebnisse hatte, schließt daraus, daß der Pilz fähig ist, während des Sauerstoffmangels seinen Energiebedarf durch intramolekulare Atmung zu decken. Eine endogene Atmung ist bei den meisten Mikroorganismen vorhanden und kann durch Substratmangel gesteigert bzw. durch ein spezifisches Nährstoffangebot erniedrigt werden. Blumenthal u. Mitarb. (1957) zeigten, wie man bei *Penicillium chrysogenum*, bei dem normalerweise der Anteil der endogenen Atmung am Stoffwechsel recht hoch ist, diese Art des anaeroben Stoffwechsels durch Acetatgaben unterdrücken kann. Auch durch Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes läßt sich die endogene Atmung ebenso wie die Gärung zugunsten der Sauerstoffatmung zurückdrängen. Bei der endogenen Atmung und bei der Gärung werden vorwiegend Kohlenhydrate abgebaut, die unter diesen Bedingungen erheblich geringere Energiemengen liefern als bei der oxybiotischen Atmung. Da offensichtlich eine Beziehung zwischen Stoffwechsel und Wuchsform besteht, verwendeten Blumenthal u. Mitarb. nur submers gewachsenes Mycel zu ihren Untersuchungen. Erikson u. Webley (1953) stellten fest, daß bei dem Actinomyceten *Micromonospora vulgaris* das Luftmycel zwar eine aktive O_2-Aufnahme zeigt, das Bodenmycel flüssiger Nährsubstrate jedoch überhaupt keinen Sauerstoff aufnimmt. Sowohl für *Aspergillus* (Tamiya 1942) als auch für *Neurospora* (Zalokar 1959) konnte nachgewiesen werden, daß zwischen den Enzymsystemen des Luftmycels und denen des Submersmycels erhebliche Unterschiede bestehen. Da Luft gegenüber Wasser eine wesentlich höhere Sauerstoffkapazität besitzt, ergibt sich gerade an der Oberfläche des Nährbodens ein starkes Sauerstoffgefälle.

Die Hyphen einer Pilzkolonie sind also je nach Lage ganz verschiedenen Sauerstoffspannungen ausgesetzt. Geht man davon aus, daß auch bei *Aspergillus* je nach Sauerstoffangebot die Oxybiose oder die Anoxybiose vorherrschen, so ist bei einer im luftgesättigten Raum gewachsenen Kolonie das Luftmycel mit den normalen Conidienträgern und Perithecien als die Wuchsform der Sauerstoffatmung anzusehen. Die sterilen Boden- und Submersmycelien wären hingegen als die Wuchsformen des anaeroben Stoffwechsels zu bezeichnen. *Vermutlich ist der Sauerstoff der wichtigste induzierende Faktor bei der Anlage von Conidienträgern und Ascogonen.* Die Tatsache, daß unter erniedrigter Sauerstoffspannung als erstes die Sporulation und die Perithecienbildung gehemmt werden, scheint für die wesentliche Rolle des Sauerstoffs bei der Ausbildung der Conidienträger und Perithecien zu sprechen. Der Sauerstoffpartialdruck in der Sauerstoffmangelkultur und in der obersten Nährbodenschicht von Kulturen im luftgesättigten Raum dürfte einen so niedrigen Wert haben, daß die geringe Energieausbeute des Stoffwechsels eine Weiter-

entwicklung und Differenzierung von Conidienträgern und Perithecien verhindert. Die angelegten Sterigmen und Ascogone wachsen zu sterilen Hyphen aus.

Die Abhängigkeit der Sterigmenmorphosen vom p_H-Wert stellt ein sehr komplexes Problem dar. Es müssen dabei einige Faktoren berücksichtigt werden, die unter den Bedingungen einer Pilzkultur schwer zu kontrollieren sind, so z.B. die Ausfällung von Schwermetallionen im alkalischen Bereich, die Giftwirkung organischer Säuren, die Änderung des IEP der Zellmembran usw. Diese Vorgänge können natürlich alle auf dem Weg über die Stoffwechselvorgänge einen Einfluß auf die Morphogenese haben. Außerdem führt die Veränderung des p_H-Wertes stets zu einer Änderung des Redoxpotentials im Nährboden, einem ganz entscheidenden Faktor für den Stoffwechsel der Mikroorganismen. Eine Erhöhung der Wasserstoffionenaktivität wirkt wie die Erhöhung des wirksamen Sauerstoffpartialdruckes. Unter der Voraussetzung, daß die Atmung einen Einfluß auf die Entstehung der Proliferationen hat, dürfte auch die Höhe des Redoxpotentials für die Morphogenese wichtig sein.

Nicht nur bei den Sauerstoffmangelversuchen, sondern auch bei den Untersuchungen über den Einfluß der Hydratur konnten wir analoge Reaktionsweisen für *Asp. repens* und *Asp. amstelodami* feststellen. Thielke (1957, 1958) wies bereits darauf hin, daß die größte Anzahl proliferierter Sterigmen bei beiden Pilzen bei einem Gehalt von etwa 3% Rohrzucker im Nährboden entsteht. Werden höhere Zuckerkonzentrationen geboten, so geht die Neigung zu Proliferationen zurück. Für die emersen Proliferationen von *Asp. repens* ist allerdings zusätzlich zu dem geringen Zuckergehalt des Nährbodens noch eine hohe Wasserdampfsättigung Voraussetzung. Diese hohe Hydratur der Gasphase dürfte auf Grund der geringen Sauerstoffkapazität des Wassers die Sauerstoffversorgung des Pilzes erschweren. *Asp. repens*, der — wie auch unsere Sauerstoffmangelversuche zeigten — besonders empfindlich gegen die Erniedrigung des Sauerstoffpartialdrucks ist, wird vielleicht schon durch den verringerten Sauerstoffgehalt der wasserdampfgesättigten Atmosphäre veranlaßt, sich auf den endogenen Stoffwechsel umzustellen. Erhöht man aber das Angebot an vergärbaren Kohlenhydraten durch eine höhere Zuckerkonzentration im Nährboden, so dürfte daraus ein größerer Energiegewinn resultieren, der eine normale Sterigmenbildung ermöglicht. Schwieriger gestaltet sich die Deutung des Rückgangs der submersen Sterigmenproliferationen von *Asp. amstelodami* im Nährboden mit erhöhter Zuckerkonzentration. Vielleicht liegt hier eine Wirkung des ebenfalls erhöhten osmotischen Werts vor. Durch den damit verbundenen Entzug von Wasser aus den Zellen kann die Atmung gehemmt (Christophersen 1960) und damit die Anlage von Conidienträgern im Substrat unterbunden werden.

Zwei vom Stamm *A 45* abstammende Sektorenvarianten, über die noch an anderer Stelle berichtet werden soll, haben die Fähigkeit zur Bildung vollwertiger Conidienträger und Perithecien verloren. Ihre Conidienträger entwickeln nur stark proliferierende Sterigmen, die den Morphosen des Ursprungsstammes sehr ähnlich sind und auch eine vermehrte Anzahl von Kernen besitzen. Daß in den proliferierten Sterigmen die Zahl der Kerne regelmäßig erhöht wird, wird verständlich, wenn man die Morphosen als Stadien der Entdifferenzierung auffaßt; sie entsprechen dann auch in der Kernzahl gewöhnlichen vegetativen Hyphen. Die strenge Koordination von Kern- und Zellteilung bei den differenzierten Organen ist bei *Asp. amstelodami* und wahrscheinlich auch bei anderen Pilzen an einen spezifischen Sauerstoffpartialdruck gebunden.

Das Phänomen der Entdifferenzierung der von der Endblase angelegten Sterigmen läßt sich, wie wir gesehen haben, durch verschiedene Faktoren hervorrufen. Wir haben jedoch versucht, wahrscheinlich zu machen, daß diese Erscheinung auf eine bestimmte Funktion der Zelle zurückgeht, auf das Atmungssystem. Daß eine Störung der Sauerstoffatmung oder eine Umstellung auf „minderwertigere" Arten der Energiegewinnung auch zu einfacheren Strukturen führt, darauf hat vor allem Warburg (1955) hingewiesen. Der extremste Fall ist vielleicht die den Krebs bewirkende Dedifferenzierung der Zellen. Warburg führt sie zurück „auf die Zerstörung eines in den Plasmagranula lokalisierten Mechanismus der aeroben Oxydation, der für die Aufrechterhaltung der Differenzierung normaler Zellen verantwortlich ist". Nach unseren Befunden möchten wir die Vermutung äußern, daß die Beeinflußbarkeit eines solchen für die aerobe Oxydation verantwortlichen Mechanismus auch der Grund sein dürfte für die morphogenetische Labilität der Gattung *Aspergillus*.

Während der Drucklegung der Arbeit erschien ein Bericht über das Auftreten von ähnlichen Proliferationen bei *Asp. niger* (Miller u. Anderson 1961). Sie entstehen ebenfalls bevorzugt unter anaeroben Bedingungen.

Zusammenfassung

1. Die normalen Conidienträger von *Aspergillus amstelodami* bilden einkernige Conidien an einkernigen Sterigmen. Der Sterigmenkern teilt sich, wenn eine neue Conidie entsteht, und ein Tochterkern wandert in die Conidie ein.

2. Nur an submers angelegten Conidienträgern entstehen proliferierte Sterigmen. Sie besitzen eine größere Anzahl Kerne und zeigen damit den Charakter vegetativer Hyphen.

3. Die submersen Sterigmenproliferationen entstehen bevorzugt bei pH-Werten zwischen 6,0 und 6,8 und werden durch Magnesiummangel gefördert.

4. Mit steigender Zuckerkonzentration und fallender Hydratur des Nährbodens nimmt die Neigung zur Proliferation ab. Die Hydratur der Gasphase hat keinen Einfluß auf die submersen Sterigmenproliferationen.

5. In einer Stickstoffatmosphäre mit einem Sauerstoffrestgehalt von etwa 2,5% bildet *Asp. amstelodami* auch Sterigmenproliferationen an Conidienträgern des Luftmycels aus.

6. Belichtung fördert die Conidienbildung, zeigt aber keine Auswirkung auf die Entwicklung der Sterigmenproliferationen.

7. Als Grund für die Entdifferenzierung der Sterigmen wird die Umstellung des Stoffwechsels von oxybiotischen auf anoxybiotische Prozesse angenommen.

Herrn Prof. Dr. H. Drawert bin ich für die Anregung zu dieser Arbeit und sein stetes Interesse zu Dank verpflichtet. Frau Prof. Dr. Ch. Thielke danke ich für ihre wertvollen Hinweise und ihre tatkräftige Unterstützung sowie Herrn Privatdozenten Dr. H.-J. Küster für die Überlassung des von ihm entwickelten Gerätes zur Bestimmung des Sauerstoffs in der Gasphase.

Literatur

Baker, G. E.: Conidium formation in species of *Aspergilli*. Mycologia (N. Y.) **37**, 582 (1945).

Barnes, B.: Variations in *Eurotium herbariorum* (Wigg.) Link induced by the action of high temperatures. Ann. Bot. **42**, 783 (1928).

Behr, G.: Über Autolyse bei *Aspergillus niger*. Arch. Mikrobiol. **1**, 418 (1930).

Bhatnangar, G. M., and P. S. Krishnan: Studies on the germination of spores of *Aspergillus niger*. Arch. Mikrobiol. **33**, 395 (1959).

Blumenthal, H. J., H. Koffler and E. C. Heath: Biochemistry of filamentous fungi. J. cell. comp. Physiol. **50**, 471 (1957).

Boas, F.: Bemerkungen über konidienbildende Stoffe bei Pilzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **37**, 57 (1919).

Brefeld, O.: *Mucor racemosus* und Hefe. Flora (Jena) **31**, 385 (1873).

Christensen, C. M., G. C. Papavizas and C. R. Benjamin: A new halophilic species of *Eurotium*. Mycologia (N. Y.) **51**, 636 (1959).

Christophersen, J.: Sauerstoffatmung und Gärung von Bakterien und Pilzen. In: Ruhland, W.: Hdb. d. Pflanzenphysiol., Bd. XII, 2, S. 416. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1960.

Dangeard, P. A.: L'origine du périthèce chez les *Ascomycètes*. Le Bot. **10**, 1 (1907).

Diakonow, N. W.: Intramolekulare Athmung und Gährtätigkeit der Schimmelpilze. Ber. dtsch. bot. Ges. **4**, 2 (1886).

Drawert, H., u. R. Müller: Über den Wert morphologischer Merkmale für die Systematik der Gattung *Penicillium* Link. Ein Beitrag zur Variationsbreite von *Penicillium notatum* Westling. Flora (Jena) **140**, 253 (1953).

Dude, M.: Über den Einfluß des Sauerstoff-Entzuges auf pflanzliche Organismen. Flora (Jena) **92**, 205 (1903).

Erikson, D., and D. M. Webley: The respiration of a thermophilic Actinomycete, *Micromonospora vulgaris*. J. gen. Microbiol. **8**, 455 (1953).

Fiedler, H. J.: Die Wirkung der Alkaliionen auf *Aspergillus niger*. Zbl. Bakt., II. Abt. **112**, 666 (1959).

Flieg, O.: Fette und Fettsäuren als Material für Bau- und Betriebsstoffwechsel von *Aspergillus niger*. Jb. wiss. Bot. **61**, 24 (1922).

Frey, A.: La formation des cellules géantes du „*Sterigmatocystis nigra*". Revue Gén. Bot. **39**, 277 (1927).

Fries, L.: Über das Wachstum einiger *Coprinus*-Arten bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen. Ark. Bot. (Stockh.) **32**, (10), 1 (1945).

Girbardt, M.: Lebendbeobachtungen an *Polystictus versicolor* (L.) Flora (Jena) **142**, 540 (1955).

Girbardt, M.: Eine Methode zum Vergleich lebender mit fixierten Strukturen bei Pilzen. Z. wiss. Mikr. **63**, 16 (1956).

Girbardt, M.: Über die Substruktur von *Polystictus versicolor* L. Arch. Mikrobiol. **28**, 255 (1958).

Gladke, E., u. W. Brucker: Über die Ansäuerung der Nährflüssigkeit durch *Phycomyces blakesleeanus*. Arch. Mikrobiol. **29**, 53 (1958).

Glassmann, H. N.: Surface-active agents and their application in bacteriology. Bact. Rev. **12**, 105 (1948).

Hawker, L. E.: Physiology of fungi. London: University Press Ltd. 1950.

Heintzeler, I.: Das Wachstum der Schimmelpilze in Abhängigkeit von den Hydraturverhältnissen unter verschiedenen Außenbedingungen. Arch. Mikrobiol. **10**, 92 (1939).

Hrushovetz, S. B.: Cytological studies of *Helminthosporium sativum*. Canad. J. Bot. **34**, 322 (1956).

Janke, A.: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. Bd. I.: Allgemeine mikrobiologische Methoden. 2. Aufl. Dresden-Leipzig: Steinkopf 1946.

Küster, H.-J.: Beiträge zur elektrochemischen Sauerstoffbestimmung nach Tödt. Ber. dtsch. bot. Ges. **73**, 123 (1960).

Miller, C. W., and N. A. Anderson: Proliferations of conidiophores and intrahyphal hyphae in *Aspergillus niger*. Mycologia (N.Y.) **53**, 433 (1961).

Miller, D. D., and N. S. Golding: The gas requirements of molds. V. The minimum oxygen requirements for normal growth and for germination of six mold cultures. J. Dairy Sci. **32**, 101 (1949).

Porodko, T.: Einfluß der Sauerstoffspannung auf pflanzliche Mikroorganismen. Jb. wiss. Bot. **41**, 1 (1904).

Ritter, G.: Über Riesenzellen und Kugelhefe bei einigen *Mucoraceen*. Ber. dtsch. Bot. Ges. **25**, 255 (1907).

Ritter, G.: Die giftige und formative Wirkung der Säuren auf die *Mucoraceen* und ihre Beziehungen zur Kugelhefebildung. Jb. wiss. Bot. **52**, 351 (1913).

Ruhland, W.: Zur Kenntnis der interzellularen Karyogamie bei den *Basidiomyceten*. Bot. Z. **59**, 187 (1901).

Sabet, Y. S.: Preliminary study of *Penicillium egyptiacum* van Beyma. Zbl. Bakt., II. Abt. **94**, 97 (1936).

Sagromsky, H.: Der Einfluß des Lichtes auf die rhythmische Konidienbildung von *Penicillium*. Flora (Jena) **139**, 300 (1952).

Sagromsky, H.: Lichtinduzierte Ringbildung. IV. Nachklingen der Rhythmik bei *Trichothecium roseum*. Ber. dtsch. bot. Ges. **72**, 169 (1959).

Schiemann, E.: Mutationen bei *Aspergillus niger* van Tieghem. Z. Abst. Vererb. **8**, 1 (1912).

Schönborn, W.: Energetische Untersuchungen an Pilzen und Bakterien. Arch. Mikrobiol. **22**, 408 (1955).

Smith, G.: Two new species of *Aspergillus*. Brit. Mycol. Soc. Trans. **26**, 24 (1943).

Sörensen, S. P. H.: zit. in: Klein, G.: Hdb. d. Pflanzenanalyse, I, S. 480. Wien: Springer 1931.

Steinberg, R. A.: A dibasal (minimum salt, maximum yield) solution for *Aspergillus niger*; Acidity and magnesium optimum. Plant Physiol. **20**, 600 (1945).

Strugger, S.: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze, 2. Aufl. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1949.

Tamiya, H.: Atmung, Gärung und die sich daran beteiligenden Enzyme von *Aspergillus*. Advanc. Enzymol. **2**, 183 (1942).

Thielke, Ch.: Über Morphosen bei *Aspergillus*. Naturwissenschaften **44**, 521 (1957).

Thielke, Ch.: Studien zur Entwicklungsphysiologie von *Aspergillus*. I. Sterigmenproliferation bei *Aspergillus repens*. Planta (Berl.) **51**, 308 (1958).

Thom, C., and K. B. Raper: A manual of the *Aspergilli*. Baltimore: Williams and Wilkins Co. 1945.

Tomlinson, T. G.: The anaerobic metabolism of the mould fungi in relation to citric acid formation. New Phytol. **36**, 418 (1937).

Warburg, O.: Über die Entstehung der Krebszellen. Naturwissenschaften **42**, 401 (1955).

Webb, M.: The influence of magnesium on cell division. 5. The effect of magnesium on the growth of bacteria in chemically-defined media of varying complexity. J. gen. Microbiol. **5**, 485 (1951).

Wehmer, C.: Selbstvergiftung in *Penicillium*-Culturen als Folge der Stickstoff-Ernährung. Ber. dtsch. bot. Ges. **31**, 210 (1913 a).

Wehmer, C.: Übergang älterer Vegetationen von *Aspergillus fumigatus* in „Riesenzellen" unter Wirkung angehäufter Säure. Ber. dtsch. bot. Ges. **31**, 257 (1913 b).

Yuill, E.: The numbers of nuclei in conidia of *Aspergilli*. Brit. Mycol. Soc. Trans. **33**, 324 (1950).

Yuill, E., and J. L. Yuill: *Cladosarum olivaceum*, a new Hyphomycete. Brit. Mycol. Soc. Trans. **22**, 194 (1938).

Zalokar, M.: Enzyme activity and cell differentiation in *Neurospora*. Amer. J. Bot. **46**, 555 (1959).

Dr. Ilse Bleul,
Pflanzenphysiologisches Institut der Freien Universität Berlin,
1 Berlin-Dahlem, Königin Luise-Str. 1—3

Archiv für Mikrobiologie 44, 105—112 (1962)

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin

Eine Sektorenvariante mit proliferierten Sterigmen von Aspergillus amstelodami (Mangin) Thom and Church

Von
Ilse Bleul

Mit 3 Textabbildungen

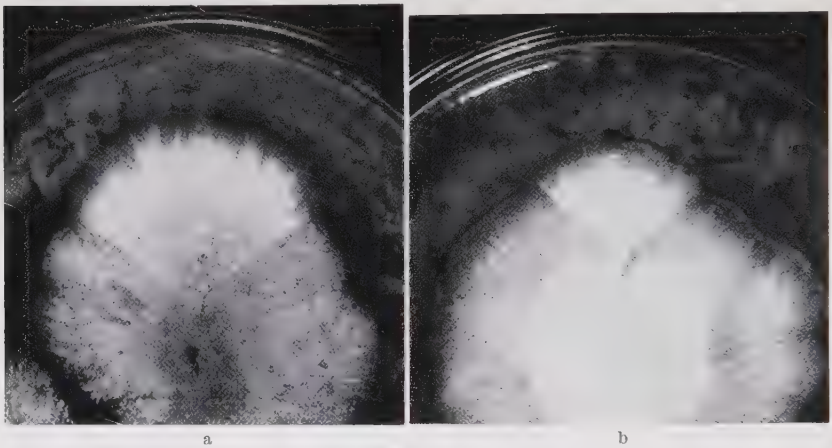
(Eingegangen am 18. Mai 1962)

Das Auftreten von Sektoren in Pilzkulturen ist oft beschrieben worden. Häufig unterschieden sich die Abkömmlinge nur durch eine vom Ausgangsstamm verschiedene Färbung, ohne Abweichungen morphologischer Art zu zeigen, so bei den von Schiemann (1912) untersuchten Farbmutanten von *Aspergillus niger*. Auch Unterschiede in der Stärke der Sporulation zwischen Grundkolonie und Sektor wurden wiederholt beobachtet (Müller 1953; Reese u. Mitarb. 1949). Müller fand bei Sektorenvarianten von *Penicillium notatum* durchschnittlich doppelt so lange Conidienketten wie beim Ausgangsstamm. Auch Barnes (1928) sowie Yuill u. Yuill (1938) stellten mikroskopisch Abweichungen der Conidienbildung bei Sektorenvarianten von *Aspergillus*-Arten fest.

Bei eigenen Versuchen mit *Aspergillus amstelodami*, Stamm *A 45*, trat auf stark alkalischem Maltzinnährboden („Maltzin", Diamalt A. G. München, $p_H = 8{,}85$), hergestellt durch Zusatz von Glykokollpuffer (m/100) nach Sörensen (1931), eine Sektorenvariante auf (Abb. 1a). Sie hob sich durch ihre hellgelbe Färbung und ihre glatte Oberfläche von der olivgrün-gelb gemaserten, stärker gefalteten Grundkolonie ab. Die konkaven Begrenzungslinien ließen ein sich flächenmäßig stärker ausdehnendes Wachstum erkennen. Die Spitze des Sektors befand sich etwa $^1/_2$ cm von der Impfstelle entfernt. Über modifikativ entstandene Proliferationen am Conidienträger ist in der vorigen Mitteilung berichtet worden (Bleul 1962); hier jedoch zeigten sich bei der mikroskopischen Kontrolle Sterigmenproliferationen am Conidienträger des Luftmycels, die sich in den folgenden Abimpfungen als genetisch manifest erwiesen. Bei unserem Stamm scheinen konstante Varianten nicht oft aufzutreten, denn unter den etwa 1100 im Verlauf dieser Arbeit untersuchten normalen Kulturen des Stammes *A 45* traten keine neuen Sektorenvarianten mit konstanten Merkmalen auf. Bei einer neuen Kulturserie mit dem gleichen stark alkalischen Maltzinnährboden bildete unter 90 Kolonien eine einen Sektor mit proliferierten Conidienträgern. Aus dem Mycel dieses Sektors (als AS_2 bezeichnet) entwickelte sich eine Kolonie, die die Typeneigenschaften des früher entstandenen Sektors (AS_1) aufwies. Die Abimpfung von der Grundkolonie ergab eine für den Ausgangsstamm typische Kolonie. Beide Varianten blieben auch nach 33 (AS_1) bzw. 12 (AS_2) Passagen in allen ihren Eigenschaften identisch und zeigten keine Tendenz zum Rückschlag. Beide Varianten neigen ihrerseits zur Bildung von stärker wüchsigen hellgelben Sektoren (Abb. 1b) und schwächer wüchsigen grauweißen Sektoren.

Abimpfungen von diesen Sektoren geben rein gelbe Kolonien (AS_{gelb}) und rein grauweiße Kolonien (AS_{grau}). Diese sekundären Varianten besitzen nach 2 Jahren (— 26 Passagen) noch dieselben Eigenschaften. Mikroskopisch gesehen sind alle vier Varianten identisch.

Da bei unseren Varianten die sexuelle Fortpflanzung verlorengegangen ist, läßt sich nicht eindeutig entscheiden, ob es sich um Mutationen handelt oder nicht. THOM u. RAPER (1945) möchten den Begriff



a b

Abb. 1 a und b. *Aspergillus amstelodami*. a Grundkolonie mit Sektorenvariante; b Sektorenvariante mit gelbem Sektor

der Mutation auf solche Stämme begrenzt wissen, die konstant geblieben sind und deren Herkunft bekannt ist. Als Varianten sollen solche Sektorenabkömmlinge bezeichnet werden, die zum Zurückschlagen neigen.

Bei den Varianten entstanden im Gegensatz zum Ausgangsstamm proliferierte Conidienträger am Luftmycel und in gleichmäßiger Verteilung in den Kolonien Ascogonschrauben, aber keine Perithecien. Die Ascogone entwickelten sich nicht weiter. Die proliferierten Conidienträger wurden im Laufe des zweiten bis dritten Tages nach der Übertragung des Mycels auf frischen Nährboden angelegt. Sobald die Kolonien dem Tageslicht ausgesetzt waren, vermehrte sich die Zahl der Conidienträger wie beim Ursprungsstamm. Ihre große morphologische Variabilität (Abb. 2 a—c) unterschied diese proliferierten Conidienträger von den beim Ausgangsstamm im Nährboden aufgetretenen und den von *Aspergillus repens* am Luftmycel (THIELKE 1958) gebildeten Formen. Beim ursprünglichen Stamm von *Aspergillus amstelodami* und bei *Aspergillus repens* befanden sich die proliferierten Sterigmen eines Conidienträgers meist im gleichen Entwicklungsstadium: sie waren vielfach auch von gleicher Länge. Die Proliferationen der Varianten an einer Endblase

entwickelten sich häufig sehr unterschiedlich. Die Sterigmenproliferationen besonders älterer Conidienträger der Sektorenvariante erschienen als flaschenförmige oder blasige Auftreibungen (Abb. 2b—c). Im Vergleich dazu hatten die modifikativ entstandenen Proliferationen des Ausgangsstammes mehr das Aussehen normaler Hyphen. Bei den Varianten wuchsen einige Sterigmen zu verzweigten oder unverzweigten, bisweilen

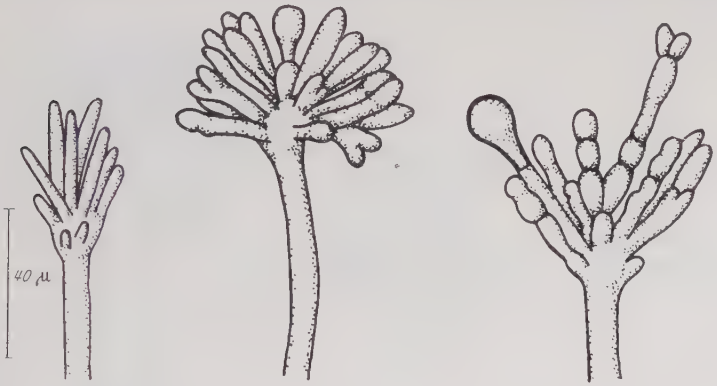


Abb. 2a—c. Conidienträger der Sektorenvarianten von *Aspergillus amstelodami* (nach Frischpräparat). a Sterigmenproliferation hyphenartig; b Keulig aufgetriebene Sterigmen; c Unregelmäßige Proliferationen mit conidienartigen Bildungen

septierten Hyphen aus, während andere ihr Längenwachstum bald einstellten und keulig anschwollen. Diese blasigen Auftreibungen fand man in älteren Kolonien mehrfach durch eine Querwand abgetrennt (Abb. 2c), sie besaßen eine zwar farblose, aber kräftigere Wand. Diese Formen waren bei einem Durchmesser von etwa 10 µ doppelt so groß wie die Conidien des Ausgangsstammes. Am Ende jeder Sterigme entstand nur eine solche terminale Blase. Niemals bildeten sich Conidienketten. Die Endblasen waren gegenüber denen des Ausgangsstammes niemals vergrößert, teilweise jedoch auf eine einfache keulige Anschwellung reduziert. Diese abnorm kleinen Endblasen trugen auf ihrem Scheitel wenige Sterigmen (Abb. 2a). Die Conidienträgerstiele waren kürzer als die normal ausgebildeter Conidienträger des Ursprungsstammes. Darauf und auf das Fehlen der Perithecien war die vergleichsweise glatt erscheinende Oberfläche und die geringe Schichthöhe der Variantenkolonien zurückzuführen. Die proliferierten Conidienträger zeichneten sich durch rasche Hinfälligkeit und Dünnwandigkeit aus. Ebenso wie der Ausgangsstamm neigten die Varianten dazu, proliferierte Conidienträger im Nährboden zu entwickeln. Die Proliferationen innerhalb des Substrates glichen den Sterigmenproliferationen des Ausgangsstammes in allen Merkmalen.

In fixierten und gefärbten Präparaten (Giemsa-Färbung, Feulgensche Nuclealreaktion, Haematoxylin-Färbung nach Heidenhain, s.a. Bleul 1962) sind die Kerne der Sektorenvarianten in Struktur, Größe und Form nicht von denen des Ausgangsstammes zu unterscheiden. Die langgestreckten „Wanderkerne" treten unter denselben Bedingungen auf wie beim fertilen Stamm (Abb. 3a—c). Die Sterigmen nehmen zunächst einen Kern aus der Endblase auf. Einwanderung eines zweiten Kernes ist

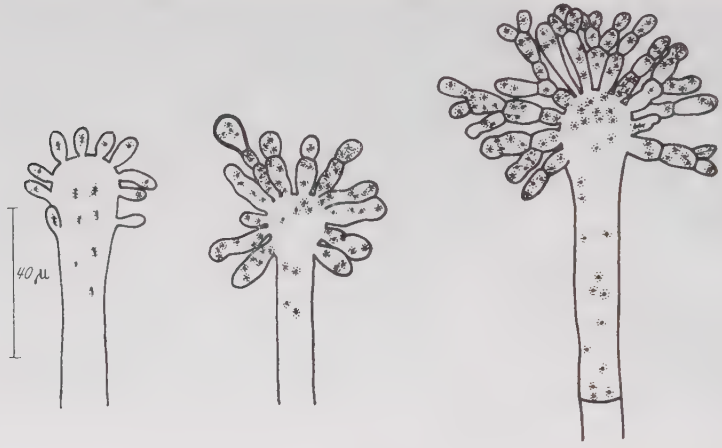


Abb. 3a—c. Conidienträger der Sektorenvarianten von *Aspergillus amstelodami* (nach Giemsa-Färbung). a Einwanderung der Kerne in die Proliferationen; b Mehrkernige proliferierte Sterigmen und conidienartige Bildung; c Septierte und verzweigte Sterigmen

in ganz seltenen Fällen zu beobachten und zwar nur bei Formen mit stark reduzierter Sterigmenzahl und unvollständig ausgebildeter Endblase. Sobald das abnorme Wachstum und das Anschwellen der Sterigmen beginnt, vermehrt sich die Zahl der Kerne in allen Sterigmenzellen erheblich (Abb. 3b—c).

Die Vermehrung der Kerne in den Sterigmenzellen läßt verschiedene Erklärungen zu. Einmal könnte es sich um einen genetischen Defekt handeln. Der Kern, der in die von der Sterigme abgegliederte Zelle einwandert, teilt sich entgegen der Regel weiter. Dadurch kommt es nicht zur Ausbildung einer normalen Conidie, die bei dieser Art nur einen Kern besitzt. Zum anderen deutet die leicht kollabierende, auffallend zarte Zellwand der Varianten darauf hin, daß aufgrund eines Defektes in der Wandbildung die Conidienbildung ausbleiben könnte.

Eine ähnliche Variante bei *Aspergillus amstelodami* (nach Thom u. Raper 1945, S. 144) mit echten aber farblosen Conidien hat Barnes (1928) gefunden. Der von Smith (1943) als neue Art beschriebene *Aspergillus proliferans*, dessen mutative Entstehung aus einem Glied der

Aspergillus glaucus-Gruppe vermutet werden kann (Thielke 1958), bildete auffallend dünnwandige Conidienträger, jedoch mit normalen Conidien aus, deren Sterigmen häufig aufgetrieben waren. Auch bei Varianten von *Aspergillus niger* traten erniedrigte Sterigmenzahl und blasige Auftreibungen der Sterigmen auf (Schiemann 1912; Yuill u. Yuill 1938). Thom u. Raper (1945) vermuten bei der von Yuill u. Mitarb. unter dem Namen „*Cladosarum olivaceum*" beschriebenen Form, die ebenso wie unsere Varianten keine Conidien mehr bildete, einen Defekt im Mechanismus der Kernwanderung. Sie meinen, daß der ruhende Kern, statt in die Conidie einzuwandern, bei den proliferierten Sterigmen im untersten Glied zurückbliebe, während der mitosebereite Kern in die von der Sterigme abgegliederte Zelle eingewandert sei. Diese Vermutung ließ sich durch unsere Untersuchungen nicht bestätigen. Auch in allen Sterigmen findet Kernvermehrung statt.

Neben der Veränderung eines oder mehrerer morphologischer Merkmale ist fast immer eine Änderung im physiologischen Verhalten des Pilzes zu beobachten. Dabei ließ sich oft schwer entscheiden, wie weit die eine Merkmalsänderung die andere bedingte. So fanden Reese u. Mitarb. (1949) einen Sektor bei *Penicillium chrysogenum*, der stärker sporulierte als der Ausgangsstamm, im Vergleich zur Grundkolonie aber viel weniger Farbstoff in das Medium abgab. Eine bei einem Stamm von *Penicillium notatum* sehr häufig auftretende Sektorenvariante zeigte neben ebenfalls gesteigerter Sporulation wesentliche Unterschiede zum Ausgangsstamm in der Einstellung des p_H-Wertes im Kulturmedium, in der Wüchsigkeit und der Penicillinbildung (Müller 1953). Sehr auffällig ist die große Zahl von konstanten Varianten mit verminderter oder gänzlicher Unfähigkeit zur Farbstoffbildung. Müller stellte fest, daß die sektoriellen Farbvarianten seines Stammes immer nur in helleren, niemals in dunkleren Farbtönen im Vergleich zur Grundkolonie auftraten. Auch Schiemann (1912) beobachtete bei ihren Farbmutanten stets hellere Farben als sie die Ausgangsform besaß. Bisweilen waren die Veränderungen im Stoffwechsel so stark, daß die Sektorenvariante sich nach einigen Passagen nicht mehr weiter vermehren ließ (Barnes 1928).

Da die modifikative Variationsbreite des Ausgangsstammes auf verschiedenen Nährböden sehr groß war, so daß sich ein Vergleich mit den Varianten recht schwierig gestaltete, wurde das Verhalten der Sektorenabkömmlinge nur auf den beiden am meisten verwendeten Nährböden geprüft. Sie entwickelten auf „Peritheciennährboden" wie auf 30% Maltzinagar die gleiche Wuchsform. Proliferationen im Nährmedium zeigten sich unter den gleichen Bedingungen wie beim Ausgangsstamm, d.h. in großer Zahl auf dem „Peritheciennährboden", dagegen blieben sie auf dem hochprozentigen Maltzinnährboden ganz aus. Die Reaktion des Substratmycels scheint sich also nicht geändert zu haben.

Da nach unseren Erfahrungen mit dem Ursprungsstamm einer der wichtigsten induzierenden Faktoren bei der Anlage von Conidien und Perithecien der Sauerstoff ist und nur durch Sauerstoffmangel beim normalen Stamm proliferierte Conidienträger am Luftmycel hervorgerufen werden können, wurden Kulturen des sterilen Variantenstammes AS_1 mehrere Tage unter stark erhöhter Sauerstoffspannung gehalten. Doch auch unter diesen Bedingungen entwickelten sich nur sterile proliferierte Conidienträger.

Bei unseren Varianten waren die Änderungen in der Pigmentproduktion besonders auffallend. Die Normalform bildet gelbe Mycel- und Perithecienfarbstoffe, olivgrüne Conidienfarbstoffe und mindestens zwei Farbstoffe, die in das Mycel abgegeben werden. Einer dieser Substratfarbstoffe ist tiefbraun, ein anderer diffundiert schneller in das Medium und fluoresciert im UV-Licht stark gelbgrün. Vermutlich besteht ein Zusammenhang zwischen der Unfähigkeit, normale Conidien zu bilden und dem gänzlichen Fehlen der Conidienfarbstoffe bei den Varianten. Dagegen traten gelbe Farbstoffe, obwohl die Perithecien fehlten, bei allen Variantenstämmen auf. Bei den primären Varianten (AS_1 und AS_2) und bei der sekundären grauen Variante begann die Gelbfärbung des Mycels im Zentrum der Kolonie erst am 4. bis 6. Tag und breitete sich dann über die ganze Kolonie aus. Die gelbe sekundäre Variante zeigte neben einer besseren Wüchsigkeit eine auch im Vergleich zum Ausgangsstamm erhöhte Produktion gelben Pigments. Die graue Variante besaß nicht nur sehr wenig Mycelfarbstoff, sondern es fehlten auch Farbstoffabscheidungen im Nährboden. Ältere Kolonien gaben nur einen im UV-Licht ganz schwach fahl grau-weiß fluorescierenden Farbstoff in das Nährmedium ab. Auch die Primär-Varianten und die gelbe sekundäre Variante bilden die Substratfarbstoffe nur vermindert. Die Fluorescenz war schwächer, jedoch auch gelbgrün. Der braune Farbstoff wird später und langsamer gebildet als beim Ursprungsstamm.

Diskussion

Der Ursprungsstamm (*Aspergillus amstelodami*, Stamm *A 45*) der vier in dieser Arbeit beschriebenen Sektorenvarianten bildet unter bestimmten Bedingungen Conidienträger mit proliferierten Sterigmen im Substrat. Obwohl bei dem nahe verwandten *Asp. repens* sowie bei *Asp. ruber* und *Asp. echinulatus* Proliferationen am Luftmycel häufig auftreten, werden bei der Art *Asp. amstelodami* Sterigmenproliferationen über dem Nährboden nur in einer nahezu sauerstofffreien Stickstoffatmosphäre ausgebildet (Bleul 1962). Die Sektorenvarianten mit den emersen Sterigmenproliferationen und zu Hyphen ausgewachsenen Ascogonen liegen zwar im Bereich der morphologischen Variationsmöglichkeiten von *Asp. amstelodami* und der verwandten Arten, deuten aber

gerade bei dieser Art auf eine tiefgreifende Veränderung der Entwicklung hin. Der Vergleich zwischen den Proliferationen des Ausgangsstammes und den Morphosen der Varianten zeigt eine stärkere Entdifferenzierung bei den Varianten. Conidien werden überhaupt nicht mehr gebildet, die Proliferationen sind kleiner, unregelmäßiger und dünnwandiger als beim Ausgangsstamm. Bei der Untersuchung der Kernverhältnisse der Sektoren ergab sich ebenso wie bei den Proliferationen des Ursprungsstammes eine Anhäufung der Kerne in den proliferierten Sterigmen. Die Betrachtung der verschiedenen Altersstadien macht es wahrscheinlich, daß erst nach der Umbildung der Sterigmen zu Hyphen die Vermehrung der Kerne einsetzt. Die Einkernigkeit der Sterigmen wird also genau wie beim normalen Stamm erst in dem Moment aufgehoben, wo diese im Zuge der Entdifferenzierung Hyphennatur annehmen. Das Verhalten des Ausgangsstammes, emerse Sterigmenmorphosen nur bei Sauerstoffmangel zu bilden, hatte uns an eine Koppelung der Morphogenese der Fruktifikationsorgane mit dem Atmungssystem denken lassen. Bei einem Defekt des Atmungssystems könnte infolge der geringeren Energieausbeute die Weiterentwicklung und Differenzierung von Conidienträgern und Perithecien verhindert werden. Mutanten mit reduzierter Atmung werden von Ephrussi, Hottinger u. Chimenses (1949) bei drei *Saccharomyces*-Arten beschrieben. Daß ein solcher Defekt bei einem im Vergleich zu den Hefen komplizierter gebauten Organismus — wie *Aspergillus* — auch morphologisch erkennbar ist, wäre durchaus denkbar.

Zusammenfassung

Auf stark alkalischem Nährboden entstanden Sektorenvarianten von *Aspergillus amstelodami*, deren Conidienträger nur proliferierte Sterigmen erzeugten. Die Varianten sind unfähig zur Bildung von Conidien und Perithecien. Ebenso wie bei den modifikativ auftretenden Proliferationen des Ausgangsstammes ist die Kernzahl in den proliferierten Sterigmen vermehrt. Die Farbstoffbildung und -abgabe ist im Vergleich zur Normalform reduziert.

Literatur

Barnes, B.: Variations in *Eurotium herbariorum* (Wigg.) Link induced by the action of high temperatures. Ann. Bot. **42**, 783 (1928).

Bleul, I.: Studien zur Morphologie und Physiologie der Sterigmenproliferation bei *Aspergillus amstelodami* (Mangin) Thom and Church. Arch. Mikrobiol. **44**, 23 (1962).

Ephrussi, B., H. Hottinger et A. M. Chimenses: Action de l'acriflavine sur les levures. I. La mutation „petite colonie". Ann. Inst. Pasteur **76**, 351 (1949).

Müller, R.: Studien über die Sektorenbildung bei *Penicillium*. Flora (Jena) **140**, 209 (1953).

Reese, E., K. Sanderson, R. Woodward and G. M. Eisenberg: Variations and mutations of *Penicillium chrysogenum* Wis. Q 176. J. Bact. **57**, 15 (1949).

Schiemann, E.: Mutationen bei *Aspergillus niger* van Tieghem. Z. Abst. Vererb. **8**, 1 (1912).
Smith, G.: Two new species of *Aspergillus*. Brit. Mycol. Soc. Trans. **26**, 24 (1943).
Sörensen, S. P. H.: zit. in: Klein, G.: Hb. d. Pflanzenanalyse, **I**, S. 480. Wien: Springer 1931.
Thielke, Ch.: Studien zur Entwicklungsphysiologie von *Aspergillus*. I. Sterigmenproliferation bei *Aspergillus repens*. Planta (Berl.) **51**, 308 (1958).
Thom, C., and K. B. Raper: A manual of the Aspergilli. Baltimore: Williams and Wilkins Co. 1945.
Yuill, E., and J. L. Yuill: *Cladosarum olivaceum*, a new Hyphomycete. Brit. Mycol. Soc. Trans. **22**, 194 (1938).

Dr. Ilse Bleul,
Pflanzenphysiolog. Institut der Freien Universität,
1 Berlin-Dahlem, Königin Luise-Straße 1—3

Lebenslauf

Ich, Frieda Helene Ilse Bleul geborene Johannes wurde am 9. August 1933 in Jena als Tochter des Oberarztes Prof. Dr. med. Dr. phil. Thilo Johannes und seiner Ehefrau Eva geborene Henneberg geboren.

Nach Beendigung der Grundschule besuchte ich das humanistische Gymnasium in Jena und von 1949 bis zu meiner Reifeprüfung im Jahre 1952 das Berlinische Gymnasium zum Grauen Kloster in Berlin.

Von 1952 bis 1959 studierte ich an den Universitäten Göttingen, Wien und Berlin. Meine akademischen Lehrer an diesen Universitäten waren die Herren Professoren: R. Harder, F. Firbas, Th. Schmucker und K. Henke in Göttingen; K. Höfler und L. Geitler in Wien; H. Drawert, Th. Eckardt, E. Werdermann, K. Herter, W. Ulrich und H. Nachtsheim an der Freien Universität in Berlin.

Im Mai 1958 bestand ich vor dem Landesprüfungsamt Berlin die Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Oberschulen wissenschaftlichen Zweiges (Lehramt am Gymnasium). Meine Doktorarbeit begann ich im Juni 1958.

Am Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin war ich seit dem 1. Oktober 1957 zunächst als studentische, seit dem 1. Oktober 1958 als wissenschaftliche Hilfsassistentin tätig. Am 1. April 1959 wurde ich mit der Wahrnehmung der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten beauftragt.

Am 23. Dezember 1959 schloß ich die Ehe mit dem Gerichtsreferendar Peter Bleul.